

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 41 408 A 1**

②1 Aktenzeichen: P 44 41 408.0
②2 Anmeldetag: 10. 11. 94
④3 Offenlegungstag: 15. 5. 96

⑤1 Int. Cl.⁸:
C 12 N 15/82
C 12 N 15/74
C 12 N 15/60
C 12 N 9/88
C 12 N 1/21
// C12Q 1/68, A01H
1/06

DE 44 41 408 A 1

⑦1 Anmelder:
Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH,
14195 Berlin, DE

⑦4 Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

⑦2 Erfinder:
Kossmann, Jens, Dr., 10715 Berlin, DE; Springer,
Franziska, 14129 Berlin, DE; Abel, Gernot J., Loibichl,
AT

⑤4 DNA-Sequenzen aus *Solanum tuberosum* kodierend Enzyme, die an der Stärkesynthese beteiligt sind, Plasmide, Bakterien, Pflanzenzellen und transgene Pflanzen enthaltend diese Sequenzen

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen aus *Solanum tuberosum*, die für Enzyme kodieren, die an der Stärkesynthese in Kartoffeln beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um zwei verschiedene Isoformen der löslichen Stärkesynthese. Weiterhin betrifft diese Erfindung Plasmide, Bakterien, sowie mit den beschriebenen DNA-Sequenzen transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierte Pflanzen. Ferner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von DNA-Sequenzen, die für lösliche Stärkesynthasen kodieren, eine in ihrer Struktur veränderte Stärke synthetisieren.

DE 44 41 408 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 03. 96 602 020/384

28/32

Für verschiedene Pflanzenspezies werden innerhalb dieser Klassen wiederum verschiedene Isoformen beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von Startermolekülen unterscheiden (sogenannte "primer dependent" (Typ II) und "primer independent" (Typ I) starch synthases).

Lediglich für die Isoform GBSS I gelang es bisher, die genaue Funktion bei der Stärkesynthese zu ermitteln. Pflanzen, in denen diese Enzymaktivität stark oder vollkommen reduziert ist, synthetisieren eine amylosefreie (sogenannte "waxy") Stärke (Shure et al., 1983, Cell 35: 225—233; Visser et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 225: 289—296; WO 92/11376), so daß diesem Enzym eine entscheidende Rolle bei der Synthese der Amylosestärke zugesprochen wird. Dieses Phänomen wird ebenfalls in Zellen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beobachtet (Delrue et al., 1992, J. Bacteriol. 174: 3612—3620). Bei *Chlamydomonas* konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß GBSS I nicht nur an der Synthese der Amylose beteiligt ist, sondern auch einen Einfluß auf die Amylopektinsynthese besitzt. In Mutanten, die keine GBSS I-Aktivität aufweisen, fehlt eine bestimmte Fraktion des normalerweise synthetisierten Amylopektins, die längererkettige Glukane aufweist.

Die Funktionen der anderen Isoformen der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, insbesondere der GBSS II, und der löslichen Stärkesynthasen sind bisher unklar. Es wird angenommen, daß die löslichen Stärkesynthasen zusammen mit Verzweigungsenzymen an der Synthese des Amylopektins beteiligt sind (siehe z. B. Ponstein et al., 1990, Plant Physiol. 92: 234—241) und daß sie eine wichtige Funktion bei der Regulation der Syntheserate bei der Stärkesynthese spielen.

Bei Kartoffel wurden die Isoformen GBSS I, GBSS II, sowie zwei Isoformen der löslichen Stärkesynthase, die bisher nicht näher bezeichnet wurden, identifiziert (Ponstein et al., 1990, Plant Physiol. 92: 234—241; Smith et al., 1990, Planta 182: 599—604).

Eine für GBSS I aus Kartoffel kodierende cDNA sowie eine genomische DNA sind bereits beschrieben (Visser et al., 1989, Plant Sci. 64: 185—192; van der Leij et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 228: 240—248). Sequenzen, die für weitere Stärkekorn-gebundene Stärkesynthasen oder eine der Isoformen der löslichen Stärkesynthase aus Kartoffel kodieren, lagen jedoch bisher noch nicht vor.

Außer bei der Kartoffel wurden lösliche Stärkesynthasen auch in einer Reihe weiterer Pflanzenarten identifiziert. Lösliche Stärkesynthasen sind beispielsweise bis zur Homogenität aus Erbse (Denyer und Smith, 1992, Planta 186: 609—617) und Mais (WO 94/09144) isoliert worden. Im Fall der Erbse stellte sich heraus, daß die als SSS II identifizierte Isoform der löslichen Stärkesynthase identisch ist mit der Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthase GBSS II (Denyer et al., 1993, Plant J. 4: 191—198). Für einige weitere Pflanzenspezies wurde das Vorhandensein mehrerer SSS-Isoformen mit Hilfe chromatographischer Methoden beschrieben, beispielsweise bei Gerste (Tyynelä und Schulman, 1993, Physiologia Plantarum 89: 835—841; Kreis, 1980, Planta 148: 412—416), Mais (Pollock und Preiss, 1980, Arch. Biochem. Biophys. 204: 578—588) und Weizen (Rijven, 1986, Plant Physiol. 81: 448—453).

Eine cDNA-Sequenz, die für eine lösliche Stärkesynthase kodiert, wurde bisher lediglich für Reis beschrieben (Baba et al., 1993, Plant Physiol. 103: 565—573).

Es sind bislang verschiedene Ansätze beschrieben worden, stärkeproduzierende Pflanzen durch Züchtung oder gentechnische Manipulation dahingehend zu verändern, daß sie eine Stärke mit veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere einem veränderten Amylose/Amylopektin-Verhältnis synthetisieren. So gelang es beispielsweise durch Züchtung eine Maissorte (waxy maize) zu etablieren, deren Stärke zu nahezu 100% aus Amylopektin besteht (Akasaka und Nelson, 1966, J. Biol. Chem. 241: 2280—2285). Desweiteren wurden verschiedene Maislinien mit einem erhöhten Amylosegehalt (60—70%) mittels züchterischer Maßnahmen erstellt, z. B. die Mutanten amylose extender und dull (Wolf et al., 1955, J. Am. Chem. Soc. 77: 1654—1659; Boyer et al., 1976, Die Stärke 28: 405—410). Auch in anderen Spezies wurden Linien erstellt, die einheitliche Stärke in Form von Amylopektin synthetisieren, z. B. bei Reis (Sano, 1984, Theor. Appl. Genet. 68: 467—473) und Gerste (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, Bemiller, Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, Orlando, 2nd Edition: 25—86) oder die hochgradig amylosehaltige Stärke synthetisieren (z. B. die wrinkled-Mutante der Erbse).

Im Falle der Kartoffel ist es bisher nicht gelungen, durch züchterische Maßnahmen gezielt Linien zu erzeugen, die in ihrer Stärkezusammensetzung derart verändert sind, daß sie an spezielle industrielle Verwendungszwecke besonders angepaßt sind. Mutagenese-Techniken, wie sie beim Mais angewandt werden, sind bei der Kartoffel nicht einsetzbar, da wegen des Vorliegens von vier Erbgutkopien eine Inaktivierung aller Kopien eines Gens technisch nicht möglich ist. Im Fall der Kartoffel wird daher vorzugsweise versucht, mit Hilfe gentechnischer Methoden Pflanzen zu erzeugen, die eine veränderte Stärke produzieren. So ist beispielsweise aus Visser et al. (1991, Mol. Gen. Genet. 225: 289—296) und der WO 92/11376 bekannt, daß durch anti-sense-Inhibition eines Gens für Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase Sorten erzeugt werden können, die weitgehend reine Amylopektin-Stärke (waxy-Stärke) bilden.

In der WO 92/14827 werden transgene Kartoffelpflanzen beschrieben, bei denen es durch anti-sense-Inhibition des Gens, das für ein Verzweigungsenzym von Kartoffel (Q-Enzym) kodiert, zur Synthese einer Stärke mit einem veränderten Amylose/Amylopektin-Verhältnis kommt. Bei der Kartoffel sind bisher jedoch keine Sorten bekannt, die hochgradig amylosehaltige Stärke synthetisieren.

Da bisher keine DNA-Sequenzen zur Verfügung standen, die für GBSS II oder die Isoformen der löslichen Stärkesynthase aus Kartoffel kodieren, war es nicht möglich die Funktion dieser Enzyme an der Stärkesynthese eindeutig aufzuklären bzw. Pflanzen herzustellen, bei denen die Aktivität dieser Enzyme verändert ist, und die es somit ermöglichen würden, eine hinsichtlich ihrer Struktur veränderte Stärke zu gewinnen.

Für weitere gentechnische Ansätze zur Modifizierung des Stärkemetabolismus in Kartoffeln ist es daher unbedingt notwendig, DNA-Sequenzen zur Verfügung zu stellen, die für weitere an der Stärkesynthese beteiligte Enzyme kodieren, wie z. B. lösliche Stärkesynthasen, von denen angenommen wird, daß sie für die Amylopektin-Synthese benötigt werden und daß sie eine wichtige Regulationsfunktion im Stärkemetabolismus besitzen.

schnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt und/oder der Stärkekorngröße, im Vergleich zu in Wildtyppflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Da angenommen wird, daß die löslichen Stärkesynthasen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Syntheserate der Stärke besitzen, ist durch eine Erhöhung der Aktivität dieser Enzyme oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen, eine Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen denkbar. Die wirtschaftliche Bedeutung der Möglichkeit des Eingriffs in die Stärkesynthese bei Kartoffelpflanzen ist offensichtlich: Die Kartoffel ist beispielsweise in Europa eine der wichtigsten Pflanzen zur Stärkegewinnung neben Mais und Weizen. Ca. 20% der in Europa jährlich produzierten Stärke wird aus Kartoffeln gewonnen. Ferner weist Kartoffelstärke im Vergleich zu Stärke aus Mais und Weizen einige vorteilhafte Eigenschaften auf, beispielsweise einen niedrigen Protein- und Lipidgehalt sowie verhältnismäßig große Stärkekörner, weshalb sie, falls dies möglich ist, vorzugsweise verwendet wird. 5 10

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können für die Herstellung transgener Kartoffelpflanzen verwendet werden, die in der Aktivität einer oder mehrerer Isoformen der löslichen Stärkesynthase verändert sind. Hierfür werden die DNA-Sequenzen in geeignete Plasmide eingebracht, mit den notwendigen regulatorischen DNA-Sequenzen für eine effiziente Transkription in pflanzlichen Zellen versehen und in pflanzliche Zellen eingeführt. Es besteht zum einen die Möglichkeit, die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen zur Inhibierung der Synthese endogener SSS-Proteine in den Zellen zu verwenden. Dies kann mit Hilfe von anti-sense-Konstrukten, eines eventuell auftretenden Co-Suppressionseffektes oder mit Hilfe von in entsprechender Weise konstruierten Ribozymen erreicht werden. Andererseits können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen zur Expression löslicher Stärkesynthasen in Zellen transgener Kartoffelpflanzen verwendet werden und so zu einer Steigerung der Aktivität löslicher Stärkesynthasen in den Zellen führen. 15 20

Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung von transgenen Kartoffelpflanzen, bei denen die Aktivitäten einer oder mehrerer Isoformen der löslichen Stärkesynthasen verändert sind, die aus folgenden Schritten bestehen: 25

A) Herstellung eines DNA-Moleküls, das zur Transformation pflanzlicher Zellen geeignet ist und folgende Teilsequenzen umfaßt:

- i) einen in Pflanzenzellen aktiven Promotor,
 - ii)
 - a) mindestens eine DNA-Sequenz, die in sense-Orientierung auf dem kodogenen Strang die Information für die Synthese einer löslichen Stärkesynthase umfaßt, oder einen Teil einer derartigen Sequenz, der lang genug ist, um in transformierten Zellen einen anti-sense-Effekt auszuüben, wobei diese Sequenz in anti-sense-Orientierung an den Promotor gekoppelt ist, so daß der nichtkodierende Strang abgelesen wird und es zur Bildung einer sogenannten "anti-sense"-RNA führt, die die Bildung des von einem endogenen Gen kodierten SSS-Proteins unterdrückt, oder
 - b) mindestens eine DNA-Sequenz, die in sense-Orientierung auf dem kodogenen Strang die Information für die Synthese einer löslichen Stärkesynthase umfaßt, oder einen Teil einer derartigen Sequenz, der lang genug ist, um für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer löslichen Stärkesynthase zu kodieren, wobei diese Sequenz in sense-Orientierung an den Promotor gekoppelt ist, so daß es zur Bildung einer in ein SSS-Protein translatierbaren mRNA kommt, und
 - iii) gegebenenfalls eine DNA-Sequenz, die die Termination der Transkription sowie die Polyadenylierung des Transkriptes gewährleistet und an das 3'-Ende der unter ii) genannten Sequenz gekoppelt ist,
- B) Transfer dieses DNA-Moleküls in pflanzliche Zellen, stabile Integration in das pflanzliche Genom und
C) Regeneration von intakten, ganzen Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen. 30 35 40 45

In einem derartigen Verfahren werden als kodierende Sequenzen für eine lösliche Stärkesynthase aus Kartoffel vorzugsweise DNA-Sequenzen verwendet, die für Proteine mit der unter Seq ID No. 1 oder der unter Seq ID No. 2 angegebenen C-terminalen Aminosäuresequenz kodieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des beschriebenen Verfahrens werden DNA-Sequenzen mit der unter Seq ID No. 1 oder der unter Seq ID No. 2 angegebenen Nukleotidabfolge verwendet. 50

Es können jedoch auch Sequenzen verwendet werden, die weitgehend mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen übereinstimmen und aus diesen Sequenzen durch Veränderungen, wie beispielsweise Insertion, Deletion oder Substitution, erzeugt werden können. Es muß hierbei jedoch gewährleistet sein, daß derartig veränderte Sequenzen noch die gewünschte Funktion ausüben. Im Fall der unter Verfahrensschritt A)ii)a) angeführten anti-sense-Inhibition sind demnach nur solche abgewandelten Sequenzen zu verwenden, die in transformierten Zellen auch einen effizienten anti-sense-Effekt bewirken, d. h. Sequenzen, die lang genug sind und einen ausreichenden Grad an Homologie zu dem Gen besitzen, dessen Expression unterdrückt werden soll. Im Fall der unter Verfahrensschritt A)ii)b) genannten Synthese einer translatierbaren mRNA sind entsprechend nur solche Sequenzen zu verwenden, die die Synthese eines enzymatisch wirksamen Proteins erlauben. Denkbar ist hier neben der Synthese des Wildtyp-Proteins auch die Synthese von Proteinen, die aufgrund von Mutationen in der DNA-Sequenz, beispielsweise durch Deletionen, Insertionen oder Substitutionen, eine veränderte enzymatische Aktivität aufweisen oder in veränderter Weise reguliert werden. 55 60

Weiterhin können auch synthetisch hergestellte DNA-Sequenzen verwendet werden, die im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 dargestellte Nukleotidabfolge aufweisen.

Der Promotor soll sicherstellen, daß die nachgeschaltete DNA-Sequenz in der Pflanze exprimiert wird. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Der Promotor kann homolog oder heterolog in Bezug auf die Pflanze sein. Sinnvolle 65

samen Promotor transkribiert werden. Für die Länge der einzelnen kodierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von anti-sense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten anti-sense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise von 5 kb nicht überschreiten.

Kodierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen kodierenden Regionen in anti-sense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine kodieren: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (Kobmann et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 230: 39—44), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme (Takaha et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 1391—1396) und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar. Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Bei den gemäß dem Verfahrensschritt A) konstruierten und zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendeten DNA-Molekülen handelt es sich vorzugsweise um die Plasmide p35S-anti-SSSA (Fig. 3) und p35S-anti-SSSB (Fig. 4).

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls die aus dem oben beschriebenen Verfahren resultierenden transgenen Pflanzenzellen und transgenen Pflanzen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E. Coli-Zellen verwendet. Transformierte E. Coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z. B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z. B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163: 181—187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1—46 und An et al. (1985) EMBO J. 4: 277—287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z. B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem

Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz kodierten Proteine erforderlich.

Gegenstand der Erfindung sind daher auch DNA-Sequenzen aus Pflanzen, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer löslichen Stärkesynthase besitzt, ausgenommen die in Baba et al. (1993, Plant Physiol. 103: 565—573) offenbarten DNA-Sequenzen aus Reis. Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet in diesem Zusammenhang eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY) beschrieben sind.

Gegenstand der Erfindung sind darüberhinaus Proteine aus *Solanum tuberosum*, die die biologischen Eigenschaften und die enzymatische Aktivität löslicher Stärkesynthasen besitzen, insbesondere lösliche Stärkesynthasen aus *Solanum tuberosum*, die die unter Seq ID No. 1 angegebene C-terminale Aminosäuresequenz aufweisen und ein Molekulargewicht von ca. 120—140 kD besitzen, wobei die Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Gelelektrophorese erfolgt, und lösliche Stärkesynthasen aus *Solanum tuberosum*, die die unter Seq ID No. 2 angegebene C-terminale Aminosäuresequenz aufweisen.

Wichtige Charakteristika einer löslichen Stärkesynthase sind: i) ihre Lokalisation im Stroma der Plastiden pflanzlicher Zellen; ii) ihre Fähigkeit zur Synthese linearer α -1,4-verknüpfter Polyglukane unter Verwendung von ADP-Glukose als Substrat. Diese Aktivität kann wie in Denyer und Smith (1992, Planta 186: 609—617) und in den Ausführungsbeispielen beschrieben bestimmt werden.

Hinterlegung

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und verwendeten Plasmide wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapester Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt.

Am 20. 10. 1994 wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) folgendes Plasmid hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pBinAR Hyg (DSMZ 9505)

Verwendete Abkürzungen

bp	Basenpaar
GBSS	granule bound starch synthase (Stärkekorngelbundene Stärkesynthase)
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalacto-Pyranosid
SSS	soluble starch synthase (lösliche Stärkesynthase)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Verwendete Medien und Lösungen

20 \times SSC:
175,3 g NaCl
88,2 g Natrium-Citrat
ad 1000 ml mit ddH₂O
pH 7,0 mit 10 N NaOH

Puffer A:
50 mM Tris-HCl pH 8,0
2,5 mM DTT
2 mM EDTA
0,4 mM PMSF
10% Glycerin
0,1% Natriumdithionit

Puffer B:
50 mM Tris-HCl pH 7,6
2,5 mM DTT
2 mM EDTA

Puffer C:
0,5 M Natriumcitrat pH 7,6
50 mM Tris-HCl pH 7,6
2,5 mM DTT
2 mM EDTA

10 \times TBS:
0,2 M Tris-HCl pH 7,5

k: SSS aus Reis
l: SSS A aus Kartoffel
m: SSS B aus Kartoffel

Die markierten Bereiche (I), (II) und (III) geben drei Peptidsequenzen an, die zwischen den verschiedenen Stärkesynthasen bzw. Glykogensynthasen stark konserviert sind. 5

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele werden die wichtigsten eingesetzten Verfahren im folgenden erläutert.

1. Klonierungsverfahren 10

Zur Klonierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescriptSKII (Stratagene) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR Hyg (DSM 9505) kloniert. 15

2. Bakterienstämme 15

Für den Bluescript-Vektor und für die pBinAR Hyg-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die in vivo excision wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet. 20

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 durchgeführt (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J. 8: 23–29).

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* 25

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen & Willmitzer (1988, Nucleic Acids Res. 16: 9877). Die Plasmid-DNA transformierter *Agrobacterien* wurde nach der Methode von Birnboim & Doly (1979, Nucleic Acids Res. 7: 1513–1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert. 30

4. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* Lcv. Desiree) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige & Skoog (1962) Physiol. Plant. 15: 473) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 μ l einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3–5minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 5 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 1,4 mg/l Zeatinriboside, 20 μ g/l Naphthylelessigsäure, 20 μ g/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,80% Bacto Agar gelegt. 40

5. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 45

6. Bestimmung der Stärkesynthase-Aktivität

Die Bestimmung der Stärkesynthaseaktivität erfolgte durch Bestimmung des Einbaus von C¹⁴-Glukose aus ADP[C¹⁴-Glukose] in ein in Methanol/KCl unlösliches Produkt wie beschrieben in Denyer und Smith (1992, Planta 186: 609–617). 50

7. Analyse von Proteinen mit Hilfe nativer Polyacrylamidgelelektrophorese 55

Zur Analyse von Proteinen mit Hilfe nativer Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel (7,5%; 0,1% Amylopektin; 0,1 M Tris/Borat pH 7,9) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,1 M Tris/Borat pH 7,9. Um Proteine nachzuweisen, die die enzymatische Aktivität einer Stärkesynthase aufwiesen, wurde das Gel über Nacht bei Raumtemperatur in 40 mM Trizin-NaOH pH 8,5; 0,5 M Citrat; 20 mM Kaliumacetat und 1 mM ADP-Glukose inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Lugolscher Lösung angefärbt. Bereiche, in denen Proteine mit Stärkesynthaseaktivität lokalisiert waren, färbten dunkel. 60

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1 65

Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die für die Isoform SSS B der löslichen Stärkesynthase aus *Solanum tuberosum* kodiert

durch Hitzebehandlung fixiert. Die Filter wurden in 0,25 M NaHPO₄, pH 7,2, 0,25 M NaCl, 7% SDS, 1 mM EDTA, 25% Formamid, 10% PEG für 2 Stunden bei 42°C vorhybridisiert. Anschließend wurden die Filter in 0,25 M NaHPO₄, pH 7,2, 0,25 M NaCl, 7% SDS, 1 mM EDTA, 25% Formamid, 10% PEG nach Zugabe der entsprechenden radioaktiv markierten Probe über Nacht bei 42°C hybridisiert. Als Probe wurde zum einen die cDNA-Insertion aus dem Plasmid pGBSSI verwendet, und zum anderen die cDNA-Insertion aus dem Plasmid pGBSSI. 5

Die Filter wurden anschließend 2 × 30 min in 0,1 × SSC, 0,5% SDS bei 65°C gewaschen und auf Röntgenfilmen exponiert.

Parallel wurden Filter derselben cDNA-Bibliothek mit der aus Reis stammenden radioaktiv markierten cDNA-Probe, die wie oben beschrieben hergestellt wurde, unter denselben Bedingungen hybridisiert wie für GBSS I und II beschrieben. Das Waschen der Filter erfolgte in diesem Fall für 2 × 30 min bei 40°C mit 2 × SSC, 0,5% SDS. Phagenklone, die nicht mit GBSS I oder GBSS II aus Kartoffel, aber mit der Reis-cDNA hybridisierten, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt. Mit Hilfe der in-vivo-excision-Methode wurden von positiven Phagenklonen E. coli-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurden geeignete Klone einer Sequenzanalyse unterzogen. 15

Ausführungsbeispiel 2

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pSSSB

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 1 erhaltenen E. coli-Klon wurde das Plasmid pSSSB (Fig. 2) isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Dideoxynukleotidmethode (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463–5467) bestimmt. Die Insertion ist 1758 bp lang. Die Nukleotidsequenz ist unter Seq ID No. 2 angegeben. 20

Ausführungsbeispiel 3

Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die für die Isoform SSS A der löslichen Stärkesynthase aus Solanum tuberosum kodiert

Aus einem Sequenzvergleich zwischen den bisher bekannten Sequenzen, die für lösliche und Stärkekorn-gebundene Stärkesynthasen aus Pflanzen kodieren (siehe Fig. 6), war ersichtlich, daß es drei stark konservierte Bereiche zwischen den verschiedenen Proteinen gibt (Bereiche (I), (II) und (III) in Fig. 6).

Um eine lösliche Stärkesynthase aus Kartoffel zu isolieren, wurden diese drei Bereiche ausgewählt, um polyklonale Peptidantikörper zu erzeugen. Dazu wurden drei synthetische Polypeptide mit den folgenden Aminosäuresequenzen hergestellt: 35

Peptid 1: NH₂—PWSKTGGLGDVC—COOH
Peptid 2: NH₂—PSRFEPGLNQLY—COOH
Peptid 3: NH₂—GTGGLRDTVENC—COOH. 40

Diese Peptide wurden an den KLH-Carrier ("keyhole limpet homocyanin") gekoppelt und anschließend zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen verwendet (Eurogentec, Seraing, Belgien).

Die resultierenden Antikörper wurden folgendermaßen bezeichnet: 45

anti-SS1 polyklonaler Antikörper gegen das Peptid 1
anti-SS2 polyklonaler Antikörper gegen das Peptid 2
anti-SS3 polyklonaler Antikörper gegen das Peptid 3. 50

Die Antikörper wurden mit angereinigten löslichen Stärkesynthasen aus Kartoffel auf ihre Spezifität hin untersucht.

Die Reinigung der löslichen Stärkesynthasen erfolgte dabei folgendermaßen:
2,5 kg Kartoffeln wurden in 2 Liter Puffer A aufgearbeitet. Nach Abtrennen der Stärke durch Zentrifugation bei 1000 g für 5 min wurde der Proteinextrakt an DEAE-FastFlow-Säulenmaterial (Pharmacia LKB) gebunden (äquilibriert mit Puffer B). Nach Waschen der Säule mit dem 5-fachen Säulenvolumen an Puffer B wurden gebundene Proteine mit 300 mM NaCl in Puffer B eluiert. Die eluierten Proteine wurden fraktionsweise aufgefangen, und Fraktionen mit einer hohen Stärkesynthase-Aktivität wurden vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Chromatographie über eine Gelfiltrationssäule (G25), die mit Puffer B äquilibriert wurde, entsalzt. Das Eluat wurde mit 1 Volumen 1 M Natrium-Citrat, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 2,5 mM DTT, 2 mM EDTA versetzt. Die Proteinlösung wurde auf eine mit Puffer C äquilibrierte Amylose-Resin-Säule (AR-Säule) aufgetragen. Die Säule wurde mit dem 20-fachen Säulenvolumen an Puffer C gewaschen. Gebundene Proteine wurden anschließend mit Puffer B eluiert. 55

Die Fraktionen, die eine hohe Stärkesynthase-Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und wiederum mit Hilfe von Gelfiltration über eine G25-Säule entsalzt.

Anschließend wurden die Fraktionen mit hoher Stärkesynthase-Aktivität auf eine mit Puffer B äquilibrierte MonoQ-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen an Puffer B gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit Hilfe eines linearen NaCl-Gradienten von 0–300 mM eluiert und fraktionsweise 65

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen die proteinkodierende Region der Isoform A der löslichen Stärkesynthase aus *Solanum tuberosum*. Diese wurde wie oben beschrieben als Xba I/Asp718-Fragment aus pSSSA isoliert und in anti-sense-Orientierung an den 35S-Promotor in pBinAR Hyg fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3: 835–846).

Die Größe des Plasmids p35S-anti-SSSA beträgt ca. 13 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Kartoffelpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen eine Verringerung der Aktivität der Isoform A der löslichen Stärkesynthase.

Ausführungsbeispiel 6

Konstruktion des Plasmids p35S-anti-SSSB und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Aus dem Plasmid pSSSB wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Xho I und Spe I ein ca. 1,8 kb großes DNA-Fragment isoliert, das die kodierende Region für die Isoform B der löslichen Stärkesynthase aus Kartoffel umfaßt, und in den mit SmaI geschnittenen Vektor pBinAR Hyg (DSM 9505) ligiert.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 4):

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al. (1980) Cell 21: 285–294).

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen einen Teil der proteinkodierenden Region der Isoform B der löslichen Stärkesynthase aus *Solanum tuberosum*. Diese wurde wie oben beschrieben als Xho I/Spe I-Fragment aus pSSSB isoliert und in anti-sense-Orientierung an den 35S-Promotor in pBinAR Hyg fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3: 835–846).

Die Größe des Plasmids p35S-anti-SSSB beträgt ca. 13 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Kartoffelpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen eine Verringerung der Aktivität der Isoform A der löslichen Stärkesynthase.

AGA	ACT	ATG	AAA	TCA	TTT	TTA	CTG	TCT	CAG	AAG	CAT	GTA	GTA	TAT	362	
Arg	Thr	Met	Lys	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Gln	Lys	His	Val	Val	Tyr		
				110					115					120		
ACT	GAG	CCT	CTT	GAT	ATC	CAA	GCT	GGA	AGC	AGC	GTC	ACA	GTT	TAC	407	5
Thr	Glu	Pro	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Tyr		
				125					130					135		
TAT	AAT	CCC	GCC	AAT	ACA	GTA	CTT	AAT	GGT	AAA	CCT	GAA	ATT	TGG	452	10
Tyr	Asn	Pro	Ala	Asn	Thr	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Trp		
				140					145					150		
TTC	AGA	TGT	TCA	TTT	AAT	CGC	TGG	ACT	CAC	CGC	CTG	GGT	CCA	TTG	497	
Phe	Arg	Cys	Ser	Phe	Asn	Arg	Trp	Thr	His	Arg	Leu	Gly	Pro	Leu		15
				155					160					165		
CCA	CCT	CAG	AAA	ATG	TCG	CCT	GCT	GAA	AAT	GGC	ACC	CAT	GTC	AGA	542	
Pro	Pro	Gln	Lys	Met	Ser	Pro	Ala	Glu	Asn	Gly	Thr	His	Val	Arg		20
				170					175					180		
GCA	ACT	GTG	AAG	GTT	CCA	TTG	GAT	GCA	TAT	ATG	ATG	GAT	TTT	GTA	587	
Ala	Thr	Val	Lys	Val	Pro	Leu	Asp	Ala	Tyr	Met	Met	Asp	Phe	Val		
				185					190					195		
TTT	TCC	GAG	AGA	GAA	GAT	GGT	GGG	ATT	TTT	GAC	AAT	AAG	AGC	GGA	632	25
Phe	Ser	Glu	Arg	Glu	Asp	Gly	Gly	Ile	Phe	Asp	Asn	Lys	Ser	Gly		
				200					205					210		
ATG	GAC	TAT	CAC	ATA	CCT	GTG	TTT	GGA	GGA	GTC	GCT	AAA	GAA	CCT	677	30
Met	Asp	Tyr	His	Ile	Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Val	Ala	Lys	Glu	Pro		
				215					220					225		
CCA	ATG	CAT	ATT	GTC	CAT	ATT	GCT	GTC	GAA	ATG	GCA	CCA	ATT	GCA	722	
Pro	Met	His	Ile	Val	His	Ile	Ala	Val	Glu	Met	Ala	Pro	Ile	Ala		35
				230					235					240		
AAG	GTG	GGA	GGC	CTT	GGT	GAT	GTT	GTT	ACT	AGT	CTT	TCC	CGT	GCT	767	
Lys	Val	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Val	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Ala		40
				245					250					255		
GTT	CAA	GAT	TTA	AAC	CAT	AAT	GTG	GAT	ATT	ATC	TTA	CCT	AAG	TAT	812	
Val	Gln	Asp	Leu	Asn	His	Asn	Val	Asp	Ile	Ile	Leu	Pro	Lys	Tyr		
				260					265					270		45
GAC	TGT	TTG	AAG	ATG	AAT	AAT	GTG	AAG	GAC	TTT	CGG	TTT	CAC	AAA	857	
Asp	Cys	Leu	Lys	Met	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Phe	Arg	Phe	His	Lys		
				275					280					285		
AAC	TAC	TTT	TGG	GGT	GGG	ACT	GAA	ATA	AAA	GTA	TGG	TTT	GGA	AAG	902	50
Asn	Tyr	Phe	Trp	Gly	Gly	Thr	Glu	Ile	Lys	Val	Trp	Phe	Gly	Lys		
				290					295					300		
GTG	GAA	GGT	CTC	TCG	GTC	TAT	TTT	TTG	GAG	CCT	CAA	AAC	GGG	TTA	947	55
Val	Glu	Gly	Leu	Ser	Val	Tyr	Phe	Leu	Glu	Pro	Gln	Asn	Gly	Leu		
				305					310					315		

60

65

GTA GTC TTG CTT GGT TCT GCT CCT GAT CCT AGG GTA CAA AAC GAT Val Val Leu Leu Gly Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln Asn Asp 515 520 525	1577	
TTT GTT AAT TTG GCA AAT CAA TTG CAC TCC AAA TAT AAT GAC CGC Phe Val Asn Leu Ala Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn Asp Arg 530 535 540	1622	5
GCA CGA CTC TGT CTA ACA TAT GAC GAG CCA CTT TCT CAC CTG ATA Ala Arg Leu Cys Leu Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His Leu Ile 545 550 555	1667	10
TAT GCT GGT GCT GAT TTT ATT CTA GTT CCT TCA ATA TTT GAG CCA Tyr Ala Gly Ala Asp Phe Ile Leu Val Pro Ser Ile Phe Glu Pro 560 565 570	1712	15
TGT GGA CTA ACA CAA CTT ACC GCT ATG AGA TAT GGT TCA ATT CCA Cys Gly Leu Thr Gln Leu Thr Ala Met Arg Tyr Gly Ser Ile Pro 575 580 585	1757	20
GTC GTG CGT AAA ACT GGA GGA CTT TAT GAT ACT GTA TTT GAT GTT Val Val Arg Lys Thr Gly Gly Leu Tyr Asp Thr Val Phe Asp Val 590 595 600	1802	
GAC CAT GAC AAA GAG AGA GCA CAA CAG TGT GGT CTT GAA CCA AAT Asp His Asp Lys Glu Arg Ala Gln Gln Cys Gly Leu Glu Pro Asn 605 610 615	1847	25
GGA TTC AGC TTT GAT GGA GCA GAT GCT GGC GGA GTT GAT TAT GCT Gly Phe Ser Phe Asp Gly Ala Asp Ala Gly Gly Val Asp Tyr Ala 620 625 630	1892	30
CTG AAT AGA GCT CTC TCT GCT TGG TAC GAT GGT CGG GAT TGG TTC Leu Asn Arg Ala Leu Ser Ala Trp Tyr Asp Gly Arg Asp Trp Phe 635 640 645	1937	35
AAC TCT TTA TGC AAG CAG GTC ATG GAA CAA GAT TGG TCT TGG AAC Asn Ser Leu Cys Lys Gln Val Met Glu Gln Asp Trp Ser Trp Asn 650 655 660	1982	40
CGA CCT GCT CTT GAT TAT TTG GAG CTT TAC CAT GCT GCT AGA AAG Arg Pro Ala Leu Asp Tyr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala Arg Lys 665 670 675	2027	45
TTA GAA TAGTTAGTTT GTGAGATGCT AGCAGAAAAA TTCACGAGAT Leu Glu 677	2073	
CTGCAATCTG TACAGGTTCA GTGTTTGCGT CTGGACAGCT TTTTATTTC	2123	50
TATATCAAAG TATAAATCAA GTCTACACTG AGATCAATAG CAGACAGTCC	2173	
TCAGTTCATT TCATTTTTTG TGCAACATAT GAAAGAGCTT AGCCTCTAAT	2223	55
AATGTAGTCA TTGATGATTA TTTGTTTTGG GAAGAAATGA GAAATCAAAG	2273	
GATGCAAAAT ACTCTGAAAA AAAAAAAAAA 2303		60

ATT	GTC	GCA	ATA	CAC	AAC	ATT	GCA	CAT	CAG	GGA	GTG	GAG	CCT	GCA	405	
Ile	Val	Ala	Ile	His	Asn	Ile	Ala	His	Gln	Gly	Val	Glu	Pro	Ala	135	
				125					130							
GTA	ACC	TAC	AAT	AAT	TTG	GGT	TTG	CCT	CCA	CAA	TGG	TAT	GGA	GCA	450	5
Val	Thr	Tyr	Asn	Asn	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	Gln	Trp	Tyr	Gly	Ala	150	
				140					145							
GTT	GAA	TGG	ATA	TTT	CCC	ACA	TGG	GCA	AGG	GCG	CAT	GCG	CTT	GAC	495	10
Val	Glu	Trp	Ile	Phe	Pro	Thr	Trp	Ala	Arg	Ala	His	Ala	Leu	Asp	165	
				155					160							
ACT	GGT	GAA	ACA	GTG	AAC	GTT	TTG	AAA	GGG	GCA	ATA	GCA	GTT	GCT	540	15
Thr	Gly	Glu	Thr	Val	Asn	Val	Leu	Lys	Gly	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	180	
				170					175							
GAT	CGG	ATA	CTG	ACA	GTT	AGC	CAG	GGA	TAC	TCA	TGG	GAA	ATA	ACA	585	
Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Gln	Gly	Tyr	Ser	Trp	Glu	Ile	Thr	195	20
				185					190							
ACT	CCT	GAA	GGG	GGA	TAT	GGG	CTA	CAT	GAG	CTG	TTG	AGC	AGT	AGA	630	
Thr	Pro	Glu	Gly	Gly	Tyr	Gly	Leu	His	Glu	Leu	Leu	Ser	Ser	Arg	210	
				200					205							
CAG	TCT	GTT	CTT	AAT	GGA	ATT	ACT	AAT	GGA	ATA	GAT	GTT	AAT	GAT	675	25
Gln	Ser	Val	Leu	Asn	Gly	Ile	Thr	Asn	Gly	Ile	Asp	Val	Asn	Asp	225	
				215					220							
TGG	AAC	CCG	TCG	ACA	GAT	GAG	CAT	ATC	GCT	TCG	CAT	TAC	TCC	ATC	720	30
Trp	Asn	Pro	Ser	Thr	Asp	Glu	His	Ile	Ala	Ser	His	Tyr	Ser	Ile	240	
				230					235							
AAT	GAC	CTC	TCC	CCC	CCT	GGA	AAG	GTT	CAG	TGC	AAG	ACT	GAT	CTG	765	35
Asn	Asp	Leu	Ser	Pro	Pro	Gly	Lys	Val	Gln	Cys	Lys	Thr	Asp	Leu	255	
				245					250							
CAA	AAG	GAA	CTG	GGC	CTT	CCA	ATT	CGA	CCC	GAT	TGT	CCA	CTG	ATT	810	40
Gln	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Pro	Ile	Arg	Pro	Asp	Cys	Pro	Leu	Ile	270	
				260					265							
GGA	TTT	ATT	GGA	AGG	CTG	GAC	TAC	CAG	AAA	GGT	GTT	GAC	ATA	ATC	855	45
Gly	Phe	Ile	Gly	Arg	Leu	Asp	Tyr	Gln	Lys	Gly	Val	Asp	Ile	Ile	285	
				275					280							
CTG	TCA	GCA	ATT	CCA	GAA	CTT	ATG	CAG	AAT	GAT	GTC	CAA	GTT	GTA	900	
Leu	Ser	Ala	Ile	Pro	Glu	Leu	Met	Gln	Asn	Asp	Val	Gln	Val	Val	300	
				290					295							
ATG	CTT	GGA	TCT	GGT	GAG	AAA	CAA	TAT	GAA	GAC	TGG	ATG	AGA	CAT	945	50
Met	Leu	Gly	Ser	Gly	Glu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Asp	Trp	Met	Arg	His	315	
				305					310							

55

60

65

SEQ ID NO.: 3
 ART DER SEQUENZ: Nukleotid mit entsprechendem Protein
 SEQUENZLÄNGE: 1925 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Solanum tuberosum
 HERKUNFT: cDNA-Bibliothek im Phagen Lambda ZAPII
 MERKMALE: von Nukleotid 1-1674 kodierende Region

EIGENSCHAFTEN: Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase
 ("granule bound starch synthase")
 Isoform: GBSS II

GGC	ACG	AGC	AAA	AGT	TTA	GTA	GAT	GTT	CCT	GGA	AAG	AAG	ATC	CAG	45	30
Gly	Thr	Ser	Lys	Ser	Leu	Val	Asp	Val	Pro	Gly	Lys	Lys	Ile	Gln	15	
1				5					10							
TCT	TAT	ATG	CCT	TCA	TTA	CGT	AAA	GAA	TCC	TCA	GCA	TCC	CAT	GTG	90	35
Ser	Tyr	Met	Pro	Ser	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	His	Val	30	
				20					25							
GAA	CAG	AGG	AAT	GAA	AAT	CTT	GAA	GGA	TCA	AGT	GCT	GAG	GCA	AAC	135	40
Glu	Gln	Arg	Asn	Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Ser	Ser	Ala	Glu	Ala	Asn	45	
				35					40							
GAA	GAG	ACT	GAA	GAT	CCT	GTG	AAT	ATA	GAT	GAG	AAA	CCC	CCT	CCA	180	45
Glu	Glu	Thr	Glu	Asp	Pro	Val	Asn	Ile	Asp	Glu	Lys	Pro	Pro	Pro	60	
				50					55							
TTG	GCA	GGA	ACA	AAT	GTT	ATG	AAC	ATT	ATT	TTG	GTG	GCT	TCA	GAA	225	50
Leu	Ala	Gly	Thr	Asn	Val	Met	Asn	Ile	Ile	Leu	Val	Ala	Ser	Glu	75	
				65					70							
TGC	GCT	CCA	TGG	TCT	AAA	ACA	GGT	GGG	CTT	GGA	GAT	GTT	GCT	GGA	270	50
Cys	Ala	Pro	Trp	Ser	Lys	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Gly	90	
				80					85							
GCA	TTA	CCC	AAA	GCT	TTG	GCT	CGA	CGT	GGC	CAC	AGA	GTT	ATG	GTT	315	55
Ala	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Gly	His	Arg	Val	Met	Val	105	
				95					100							

GGT GGT TGG GGA TTG CAT CAG ATA ATT AAT GAG AAC GAT TGG AAA	945	
Gly Gly Trp Gly Leu His Gln Ile Ile Asn Glu Asn Asp Trp Lys	305	315
TTA CAG GGT ATT GTG AAT GGG ATT GAT ACA AAA GAG TGG AAC CCT	990	5
Leu Gln Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Thr Lys Glu Trp Asn Pro	320	330
GAG TTG GAC GTT CAC TTA CAG TCA GAT GGT TAC ATG AAC TAC TCC	1035	10
Glu Leu Asp Val His Leu Gln Ser Asp Gly Tyr Met Asn Tyr Ser	335	345
TTG GAC ACG CTA CAG ACT GGC AAG CCT CAA TGT AAA GCT GCA TTG	1080	15
Leu Asp Thr Leu Gln Thr Gly Lys Pro Gln Cys Lys Ala Ala Leu	350	360
CAG AAG GAA CTT GGT TTA CCA GTT CGT GAT GAT GTC CCA CTG ATC	1125	20
Gln Lys Glu Leu Gly Leu Pro Val Arg Asp Asp Val Pro Leu Ile	365	375
GGT TTC ATT GGG AGG CTT GAC CCA CAA AAG GGT GTT GAT CTG ATT	1170	25
Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Pro Gln Lys Gly Val Asp Leu Ile	380	390
GCT GAG GCC AGT GCT TGG ATG ATG GGT CAG GAT GTA CAA CTG GTC	1215	30
Ala Glu Ala Ser Ala Trp Met Met Gly Gln Asp Val Gln Leu Val	395	405
ATG TTG GGG ACG GGG AGG CGT GAC CTT GAA CAG ATG CTA AGG CAA	1260	35
Met Leu Gly Thr Gly Arg Arg Asp Leu Glu Gln Met Leu Arg Gln	410	420
TTT GAG TGT CAA CAC AAT GAT AAA ATT AGA GGA TGG GTT GGT TTC	1305	40
Phe Glu Cys Gln His Asn Asp Lys Ile Arg Gly Trp Val Gly Phe	425	435
TCT GTG AAG ACT TCT CAT CGT ATA ACT GCT GGT GCA GAC ATT CTG	1350	45
Ser Val Lys Thr Ser His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Ile Leu	440	450
CTC ATG CCT TCT AGA TTT GAG GCC TTG CGA CTG AAC CAG CTT TAT	1395	50
Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Ala Leu Arg Leu Asn Gln Leu Tyr	455	465
GCA ATG AAA TAT GGG ACT ATT CCT GTT GTT CAT GCA GTA GGA GGA	1440	55
Ala Met Lys Tyr Gly Thr Ile Pro Val Val His Ala Val Gly Gly	470	480
CTC AGA GAT ACT GTG CAG CCC TTT GAT CCT TTT AAT GAG TCA GGA	1485	60
Leu Arg Asp Thr Val Gln Pro Phe Asp Pro Phe Asn Glu Ser Gly	485	495
CTG GGG TGG ACC TTC AGT AGG GCT GAA GCT AGC CAG CTG ATC CAC	1530	65
Leu Gly Trp Thr Phe Ser Arg Ala Glu Ala Ser Gln Leu Ile His	500	510

baren mRNA, die die Synthese einer endogenen löslichen Stärkesynthase in eukaryontischen Zellen verhindert, wobei die DNA-Sequenzen in anti-sense-Orientierung an einen Transkriptions-Promotor gekoppelt sind.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

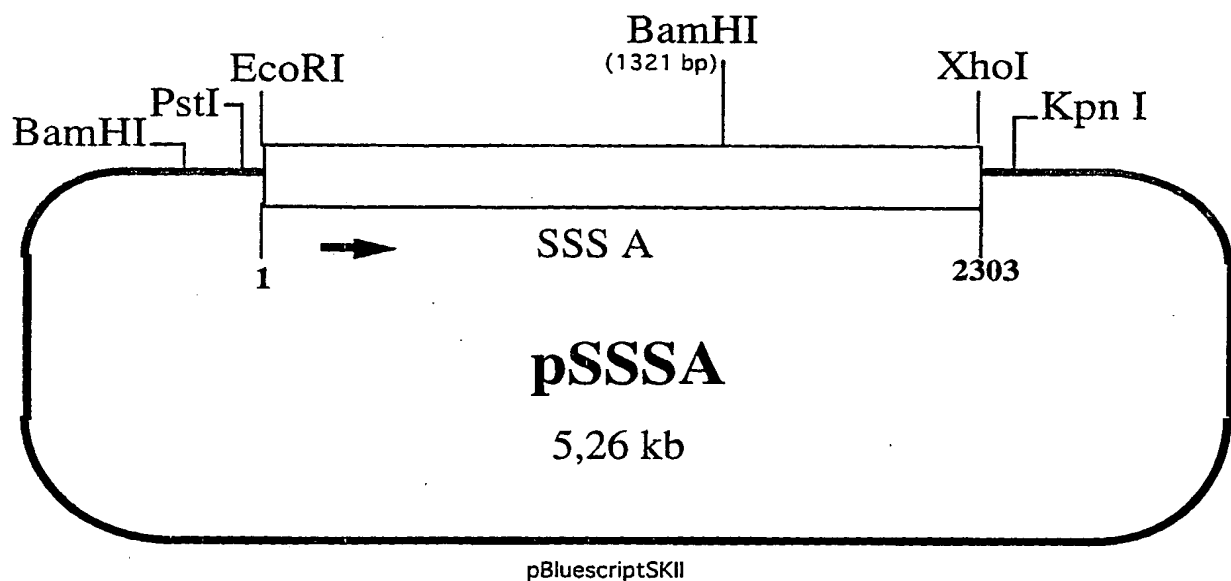


Fig. 1

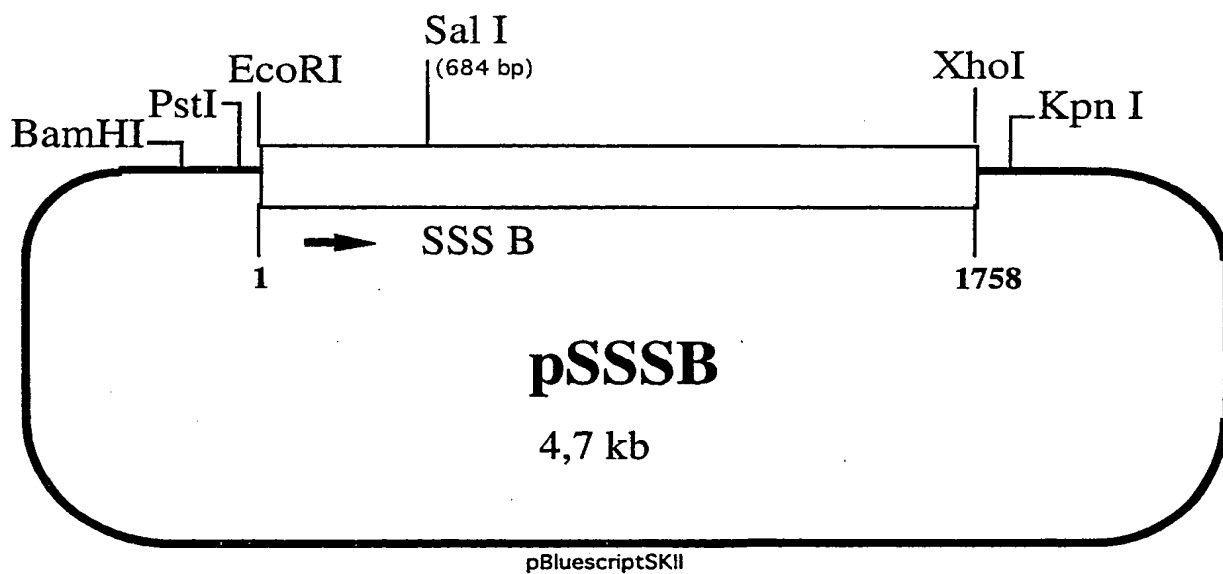


Fig. 2

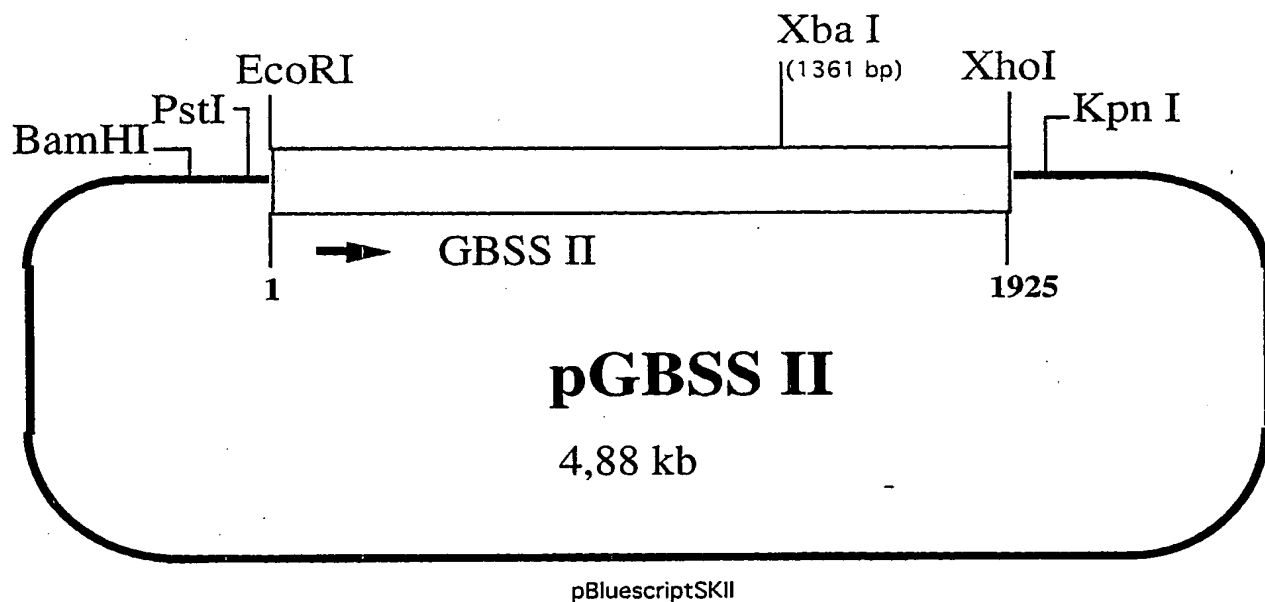


Fig. 5